

# INMOVILIZACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA SOBRE SUPERFICIES DE TITANIO MODIFICADAS POR PLASMA

C. Osorio<sup>1</sup>, J. Morales<sup>1\*</sup>, M.G. Olayo<sup>2</sup>, G.J. Cruz<sup>2</sup>,  
R. Montiel<sup>1</sup>, E. Pérez<sup>3</sup>, H. Vazquez<sup>1</sup>, R. Olayo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física, UAM-I, Apdo. Postal 55-534, Iztapalapa, México, D.F. [jmor@xanum.uam.mx](mailto:jmor@xanum.uam.mx)

<sup>2</sup>Departamento de Síntesis y Caracterización, ININ, Apdo. Postal 18-1027, CP 11801, México, D.F.

<sup>3</sup>Instituto de Física, UASLP, Apdo. Postal 78290, SLP, México.

## Resumen

En este trabajo se combinan dos técnicas para producir películas delgadas. La primera consiste en el depósito por plasma de una capa delgada de polipirrol (PPy) sobre superficies de Titanio. La otra técnica es el auto-ensamblado capa por capa de polímeros iónicos, polication/polianión, que permitan la inmovilización de la enzima fosfatasa alcalina (FA), asociada a la osteogénesis y dentinogénesis. Los sustratos de Ti se someten a una descarga de plasma de aire para su limpieza y para la formación de radicales sobre la superficie del metal. A continuación se sintetiza PPy sobre Ti buscando que haya una fuerte adhesión en la interfase Ti-PPy, y que además se genere una superficie con carga positiva, resultante de la presencia de los grupos amina provenientes del pirrol. A partir de esta primera capa se auto-ensamblan polialilamina hidrociorada (PAH), con carga positiva, y poliestireno sulfonado (PSS), con carga negativa, por adsorción de polielectrolitos aniónicos y catiónicos en solución acuosa. El resultado son películas que favorecen la adhesión de la FA. Las muestras se caracterizaron por espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (IR-ATR) y microscopía de barrido electrónico (SEM). En este estudio se prepararon sustratos de Ti recubiertos con PPy a diferentes potencias (30, 50 y 100 W). A partir de la primera capa de PPy se autoensamblaron las siguientes muestras: Ti-PPy-PAH-FA, Ti-PPy-PSS-FA, Ti-PPy-PAH-PSS-FA y Ti-PPy-FA. Este estudio puede contribuir a la tecnología de implantes dentales de titanio que permitan la regeneración de la masa ósea de los maxilares.

## Introducción

Los biomateriales tienen un papel importante en la medicina moderna con una amplia gama de aplicaciones que incluyen: dispositivos médicos, implantes artificiales, dispositivos liberadores de drogas y soportes para la regeneración de tejidos. Las estrategias para su diseño van desde materiales que sean “invisibles” al sistema biológico hasta materiales “inteligentes” que interactúan con el tejido que lo rodea, estimulando la proliferación o regeneración de las células, o sirviendo como guía para el crecimiento de tejido dañado. Una de las estrategias más usadas en esta tarea es aumentar la integración cohesiva entre el implante y el tejido celular, creando una interfase fuerte entre el biomaterial y el tejido que lo rodea para aumentar la funcionalidad del implante y su vida media dentro del sistema biológico [1]. Una interfase deseable para los biomateriales necesita la modificación superficial del biomaterial mediante la formación de interfases, que pueden ser de polímeros orgánicos que contengan grupos funcionales coadyuvantes de la interacción del biomaterial con su entorno celular.

La polimerización por plasma ha sido poco usada para depositar películas delgadas de polímeros sobre metales o sus aleaciones para ser usadas en el campo médico y en implantes dentales. Las películas formadas por plasma generalmente no contienen huecos, se adhieren fuertemente a una gran variedad de materiales y resisten tratamientos físicos y químicos debido a su naturaleza entrecruzada [2-4]. Una limitación de esta técnica es la baja densidad de grupos reactivos que pueden ser implantados en la superficie [5]. La exposición de sustratos de titanio a descargas de plasma puede introducir grupos funcionales reactivos –por ejemplo, aminas, si se usa pirrol– modificando significativamente la composición química superficial del titanio.

La adsorción de polímeros iónicos con carga opuesta a la carga superficial se puede usar como un método muy efectivo para estabilizar y aumentar los centros de carga reactiva, formados sobre la

superficie del titanio después del tratamiento inicial por plasma. La alta densidad de estos polímeros iónicos, combinada con la estructura macromolecular de las cadenas poliméricas funciona como un contraíón masivo que permite una rápida adsorción de una superficie débilmente cargada. Los polielectrolitos forman una gran cantidad de enlaces con la superficie, generando una monocapa altamente estable con una concentración difusa de centros cargados y débil carga electrostática.

En este trabajo se estudia la modificación superficial por plasma de superficies de titanio que permitan el anclado de la fosfatasa alcalina (FA), una proteína usada en la regeneración de material óseo.

## Experimental

En la Fig. 1 se muestra un esquema del reactor usado para procesamientos por plasma; en este trabajo se configuró para sintetizar capas delgadas de polipirrol. El reactor está formado por un cuerpo cilíndrico de vidrio Pyrex de 9 cm de diámetro externo. En cada extremo tiene dos bridas de acero inoxidable, en cuyo centro hay un puerto de acceso para electrodos construidos también de acero inoxidable. Por una de las bridas se conecta el sistema de vacío, una bomba mecánica, y el medidor de presión tipo Pirani. Por la otra brida se introduce el monómero que se va a polimerizar. Los electrodos están conectados a un amplificador de voltaje y a un generador de radiofrecuencia. Las condiciones de operación fueron: presión de  $6 \times 10^{-2}$  Torr, potencia de 30, 50 y 100 W, frecuencia de 13.5 MHz, y tiempo de reacción de 30 minutos. Se utilizó pirrol marca Aldrich grado reactivo.

Después del depósito de la película delgada de PPy, los sustratos se sumergieron en una solución de polímero iónico (PAH ó PSS) por 20 min, y se lavaron con agua destilada antes de sumergirse en el siguiente polímero. Se prepararon las siguientes muestras: Ti-PPy, Ti-PPy-PAH, Ti-PPy-PSS, Ti-PPy-FA, Ti-PPy-PAH-FA y Ti-PPy-PSS-FA. El análisis de las muestras se realizó por medio de espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada, IR-ATR, y por microscopía de barrido electrónico, SEM.

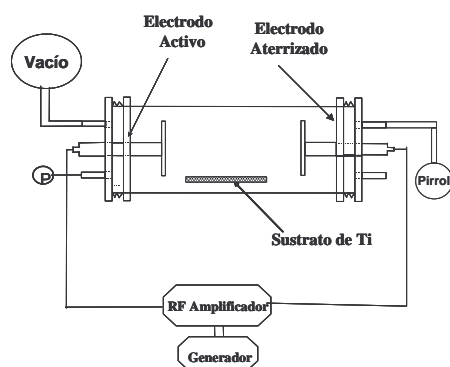


Fig. 1. Reactor de polimerización por plasma.

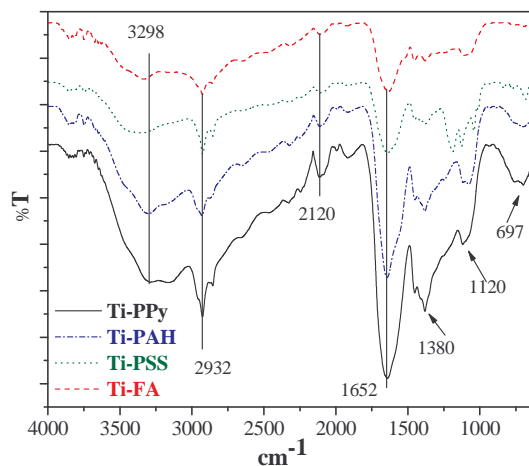


Fig.2. Espectros IR-ATR de Ti con PPy, PAH, PSS y FA.

## Resultados y discusión

### Espectroscopia de IR-ATR

La Fig. 2 muestra los espectros de IR-ATR de Ti recubierto con los diferentes polímeros. Los cuatro espectros de esta figura muestran bandas anchas y complejas en la región de  $3300\text{ cm}^{-1}$ , características de los materiales sintetizados por plasma, debido a que, al exponerse al aire se oxidan dichos materiales y pueden adquirir un poco de humedad. Sin embargo, los espectros de Ti-PPy y Ti-PAH exhiben una banda ancha adicional en  $3200\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las aminas provenientes del anillo pirrólico y a las sales de aminas de la PAH. En la región de  $2932\text{ cm}^{-1}$  de todos los espectros se encuentran las bandas de vibración de tensión de los C-H alifáticos, y su correspondiente banda de flexión en  $1380\text{ cm}^{-1}$ . Tales grupos, en el caso del Ti-PPY son originados por ruptura de algunos anillos aromáticos del pirrol. Asimismo, en  $2120\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la absorción característica del enlace nitrilo,  $\text{C}\equiv\text{N}$ , que podría originarse también de esta ruptura en Ti-PPy. El pico ancho desplazado hacia  $1652\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los grupos  $\text{C}=\text{O}$  cetónicos, de la oxidación del proceso por plasma, está presente en todos los espectros de los polímeros depositados. El espectro de Ti-PSS presenta tres pequeños picos en la misma zona de  $1120\text{ cm}^{-1}$  originados por los enlaces  $\text{O}=\text{S}$  del PSS.

En los espectros de la Figuras 3 y 4 se nota ensanchamiento y/o disminución de intensidad de las bandas discutidas anteriormente para la Figura 2, dependiendo de la estructura del polímero que fue depositado para formar la última capa. En efecto, el espectro de Ti-PPy-PSS (Fig. 3) exhibe predominantemente bandas correspondientes al PSS ( $190$ ,  $1130$  y  $1042\text{ cm}^{-1}$  del grupo  $\text{S}=\text{O}$  del sulfonato en Fig. 2, 3 y 4). Cuando se le adiciona un polielectrolito, los espectros en esta región se combinan en absorciones más anchas y complejas asociadas a los grupos  $\text{P}-\text{OH}$ ,  $\text{P}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{S}$ , y  $\text{S}=\text{O}$ . Asimismo, en los espectros de los materiales cuya última capa es FA predominan las bandas de esta capa (Figs. 3 y 4) en la región de  $3350\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ . La presencia de la FA se puede evidenciar por la presencia del pequeño pico, más agudo que en los demás espectros, en la región de  $3300\text{ cm}^{-1}$  (Figs. 3 y 4). La presencia de las aminas de PAH se muestra en el pico centrado en  $1650\text{ cm}^{-1}$ , más ancho por la oxidación adicional del procesamiento por plasma (Fig. 4).

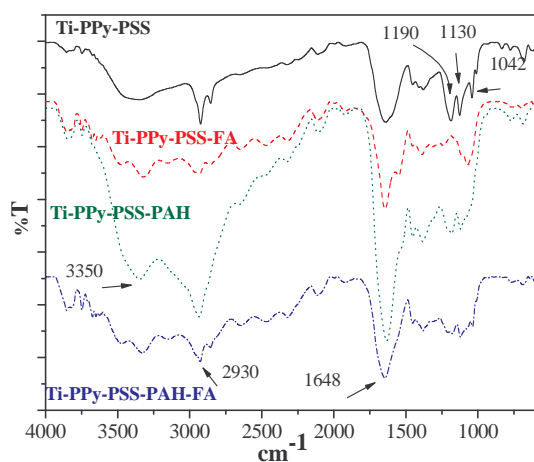


Fig. 3. Espectros ATR de Ti-PPy-PSS con FA, PAH y FA.

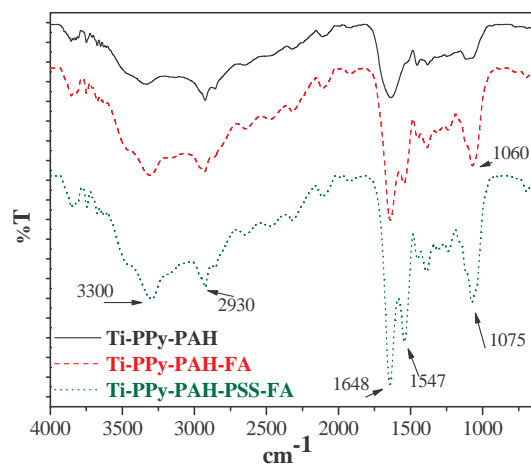


Fig. 4. Espectros ATR de Ti-PPy-PAH con FA y PSS.

### Morfología

En la Fig. 5 se presenta un sustrato de Ti recubierto con una capa homogénea de PPy. En la Fig. 6 se presenta el perfil de la capa de PPy después de su inmersión en PAH. El espesor es de aproximadamente  $700\text{ nm}$  con superficie lisa.

En la Fig. 7 se muestra una imagen de SEM de Ti-PPy-PSS, donde se observa una capa de material agrietado, pero sin ruptura total de la capa; y sobre ella, varias esferas con diámetro aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , unidas entre sí. Es posible que las cadenas de PSS, muy hidrofílicas por la presencia del grupo sulfonato, sirvan como sitios de nucleación para formar estas esferas. En la Fig. 8 se presenta una microfotografía de Ti-PPy-FA que contiene rugosidades y hojuelas que sobresalen de la superficie debido al efecto de la FA sobre el material.

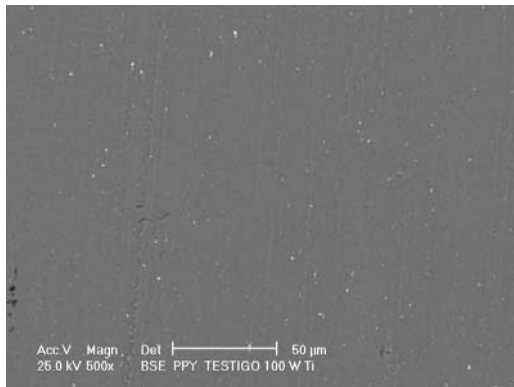


Fig. 5. Micrografía de Ti-PPy.

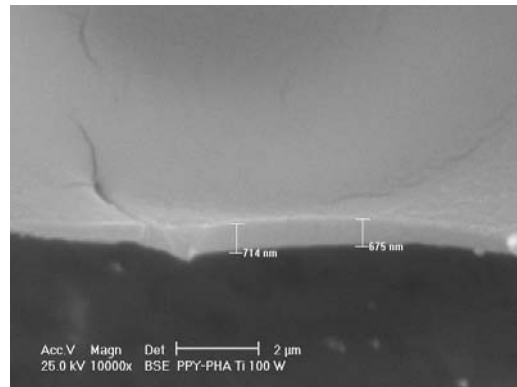


Fig. 6. Micrografía de Ti-PPy-PAH.

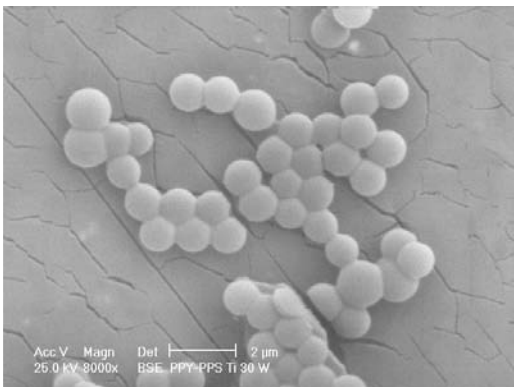


Fig. 7. Micrografía de Ti-PPy-PSS.

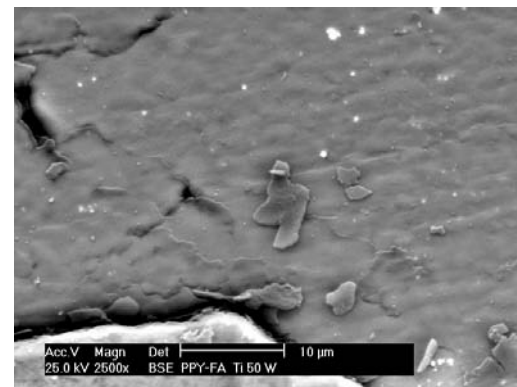


Fig. 8. Micrografía de Ti-PPy-FA.

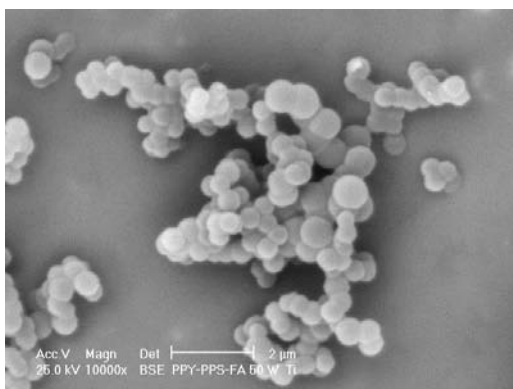


Fig. 9. Micrografía de Ti-PPy-PSS-FA.

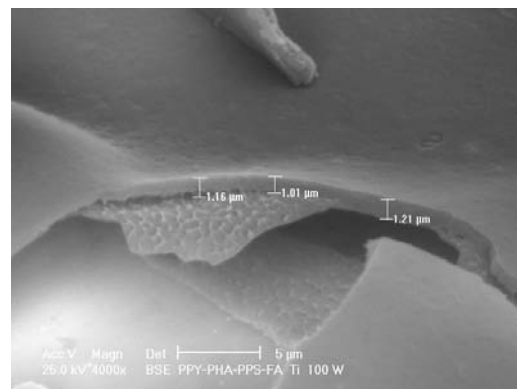


Fig. 10. Micrografía de Ti-PPy-PAH-PSS-FA.

La Fig. 9 muestra el autoensamble de Ti-PPy-PSS-FA donde se observa la formación de esferas en estructuras tridimensionales fuertemente adheridas a la capa de PPy. Los aglomerados persis-

ten a los diferentes enjuagues con agua destilada a los que se sometieron las muestras. En la Figura 10 se aprecia el ensamble de Ti-PPy-PAH-PSS-FA con sus diferentes capas. En el extremo inferior izquierdo está el Ti; después una capa rugosa de PPy. Esta formación rugosa es típica de PPy después del contacto con algún solvente o agua. La capa externa es de aproximadamente 1.0  $\mu\text{m}$  de espesor. En ella no se pueden diferenciar los polielectrolitos que intervinieron en el ensamble. Sin embargo, se aprecia una textura lisa y suave sin agrietamientos.

### Conclusiones

Los espectros ATR muestran la presencia de los grupos  $\text{C=O}$ ,  $\text{O=S}$ ,  $\text{-P=O}$ ,  $\text{P-O}$  y de amina hidroclicada que provienen de cada una de las capas que se adicionaron al Ti. Estos grupos en la superficie sugieren que el tratamiento por plasma de Ti es capaz de activar sitios donde se pueden unir los diferentes polímeros iónicos para configurar autoensambles por medio de cargas electrostáticas. El análisis morfológico muestra que, cuando interviene el PSS, se generan estructuras globulares tridimensionales de esferas aglomeradas de tamaños similares. La FA se retiene en la superficie del ensamble con lo que podría aplicarse para implantes dentales o en casos de regeneración de masa ósea.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al programa de mejoramiento del profesorado, PROMEP, por el financiamiento parcial al desarrollo del trabajo bajo el Programa de Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo, CONVENIO PROMEP-UAM Núm. 33805, y al programa de Formación de Redes de Investigación PROMEP mediante el Proyecto "Inmovilización de Proteínas sobre Superficies Biocompatibles" (PROMEP/103.5/04/2278); Convenio PROMEP-UAM Núm. 33871.

### Bibliografía

- [1] D. Wang, Ch. G. Williams, F. Yang, J. H. Elisseeff, *Adv. Funct. Mater.* 14, 12, 1152-1159 (2004).
- [2] T. Hayakawa, M. Yoshinari, K. Remoto, *Biomaterials* 25 119-127 (2004).
- [3] H. Miyachi, A. Hiratsuka, K. Ikebukuro, K. Yano, H. Muguruma, I. Karube, *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 3, 323-329.
- [4] D.A. Puleo, R.A. Kissling, M.-S. Sheu, *Biomaterials* 23 2079-2087 (2002).
- [5] G. Greene, G. Yao, R. Tannenbaum, *Langmuir*, 20, 2739-2745 (2004).